Gélose CN pour *Pseudomonas*

DOMAINE D'UTILISATION

La gélose CN pour *Pseudomonas* est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement et le dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans les eaux embouteillées, les eaux de piscines, les eaux destinées à la consommation humaine.

HISTORIQUE

La formule du milieu de base constitue une modification du milieu de King A dans lequel le chlorure de magnésium et le sulfate de potassium favorisent la production de pyocyanine. En 1951, Lowbury préconisa l'utilisation de cétrimide dans un milieu sélectif pour l'isolement des *Pseudomonas*. En raison de l'amélioration de la pureté de l'agent inhibiteur, sa concentration fut réduite par Lowbury et Collins en 1955. Goto et Enomoto ont montré que l'addition d'acide nalidixique avec diminution de la concentration en cétrimide permettait une meilleure récupération de *Pseudomonas aeruginosa*, avec un renforcement corrélatif de la production de pigment, tandis que les contaminants (*Proteus*, *Klebsiella*, *Providencia*) de la flore associée étaient fortement inhibés.

PRINCIPES

- La peptone pancréatique de gélatine et l'hydrolysat acide de caséine constituent les substrats nutritifs nécessaires à la multiplication rapide des *Pseudomonas*.
- La production de pyocyanine (pigment bleu, non fluorescent, soluble dans l'eau et le chloroforme) est stimulée en présence de chlorure de magnésium et de sulfate de potassium.
- Les levures contaminantes sont inhibées par le cétrimide.
- L'acide nalidixique bloque la réplication de l'ADN des germes sensibles à cet agent antibactérien.
- Le milieu favorise également la production de pigments (pyoverdine, pyorubine) par certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

PREPARATION

- Mettre en suspension 48,6 g de milieu de base déshydraté (BK165) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Ajouter 10 mL de glycérol.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

NOTA :

Une liquéfaction partielle de l'agar entraînera inévitablement une altération significative de la consistance du gel du milieu solidifié, après stérilisation et refroidissement.

BIOKAR Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34

MODE D'EMPLOI

- Refroidir et maintenir à 47°C.
- Couler en boîtes de Petri stériles (l'épaisseur de gélose doit être égale à 5 mm).
- Laisser solidifier sur une surface froide.
- Filtrer stérilement sur membrane un volume déterminé de l'échantillon à tester.
- A la surface des boîtes ainsi préparées ou du milieu pré-coulé (BM070) ramené préalablement à température ambiante, déposer la membrane en veillant à ce que le contact soit parfait.
- Incuber à 36°C pendant 21 et 44 heures.

LECTURE

Procéder au comptage des boîtes ne contenant pas plus de 150 colonies. Les colonies produisant une pigmentation bleu vert (pyocyanine) seront comptées comme *Pseudomonas aeruginosa* confirmés. Les colonies ne produisant pas de pyocyanine, mais présentant une fluorescence sous rayonnement ultraviolet à 360 nm, seront considérées comme *Pseudomonas aeruginosa* présumés. Les colonies montrant une pigmentation brun rougeâtre sans présenter de fluorescence seront également considérées comme *Pseudomonas aeruginosa* présumés.

Les colonies présumées être des *Pseudomonas aeruginosa* devront être soumises à des tests de confirmation tels que : production d'ammoniac à partir d'acétamide, production d'oxydase, fluorescence sur milieu de King B.

FORMULE - TYPE du milieu (complet)

(pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pancréatique de gélatine .....16,0 g
- Hydrolysat acide de caséine .....10,0 g
- Glycérol .....10,0 mL
- Sulfate de potassium .....10,0 g
- Chlorure de magnésium.....1,4 g
- Cétrimide.....0,2 g
- Acide nalidixique .....15,0 mg
- Agar agar bactériologique.....11,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,1 $\pm$ 0,2.

CONTRÔLE QUALITE

- Milieu déshydraté de base : poudre blanc crème, fluide et homogène.
- Milieu préparé (complet) : gélose blanchâtre.
- Réponse culturale typique sur milieu complet après 44 heures d'incubation à 36°C :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité)
[1] *Pseudomonas aeruginosa*	ATCC® 9027	66% $\leq R_2 \leq$ 150%
[2] *Pseudomonas aeruginosa*	ATCC 10145	$P_R \geq$ 70%
[1] *Enterococcus faecalis*	CCM 2541	inhibée

[1] Rapport de productivité R_2 selon **NF T 90-461**
[2] Rapport de productivité P_R selon **XP CEN ISO/TS 11133-2**

BIOKAR Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34

STOCKAGE / CONSERVATION

Milieu de base déshydraté (sans glycérol) : 2-30°C.
- La date de péremption est mentionnée sur l'étiquette.
- Milieu de base préparé en flacons : non recommandé.
- Milieu complet préparé en boîtes : 30 jours à 2-8°C (à titre indicatif).

Milieu pré-coulé en boîtes de Petri :
- Stocker entre 2 et 8°C, à l'abri de la lumière.
- La date de péremption est mentionnée sur l'étiquette.

PRESENTATION	Code
Milieu complet pré-coulé en boîtes de Petri (Ø 55 mm) :	
- Coffret de 10 boîtes	BM07008
Milieu de base déshydraté (sans glycérol) :	
- Flacon de 500 g	BK165HA

BIOKAR Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34

SUPPORT PHOTO :

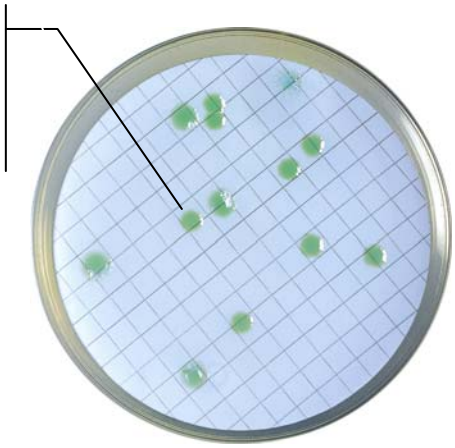
Référence : BK165HA, BM07008

Domaine d'utilisation : **I**solement et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans les eaux.

Pseudomonas aeruginosa

Colonie caractéristique

Couleur bleu vert



Gélose CN pour *Pseudomonas*

Réf : BM07008

Incubation 21 – 44 heures à 36°C (filtration sur membrane)

Colonies caractéristiques bleu vert
(production de pyocyanine)

BIOKAR Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Lowbury, E.J.L., and Collins, A.G., 1955. The use of a new cetrimide product in a selective medium for *Pseudomonas aeruginosa*., J. Clin. Pathol., 8: 47.

Brown, V.I., and Lowbury, E.J.L. 1965. Use of an improved Cetrimide Agar Medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Pathol.,18: 752.

Goto, S., and Enomoto S. 1970. Nalidixic acid cetrimide agar. A new selective plating medium for the selective isolation of *Pseudomonas aeruginosa*.

Arrêté du 19 juin 2000 (JO du 20 juillet 2000) modifiant l'arrêté du 14 octobre 1937 modifié relatif au contrôle des sources d'eaux minérales.

NF T 90-461. Juillet 2001 et NF T 90-461/A1. Juin 2005. Qualité de l'eau. Microbiologie. Contrôle qualité des milieux de culture.

XP CEN ISO/TS 11133-2 (V 08-104-2). Janvier 2004. Microbiologie des aliments. Guide pour la préparation et la production des milieux de culture. Partie 2 : Guide général pour les essais de performance des milieux de culture.

NF EN ISO 16266 (T 90-419). Août 2008. Qualité de l'eau. Détection et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa*. Méthode par filtration sur membrane.

Les mentions portées sur l'étiquette sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document.
Les informations et les spécifications contenues dans cette fiche technique ont été établies à la date du 2008-07-23.
Elles sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.
Code document : BK165/F/2002-10 : 4

BIOKAR Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34